

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

In re application of: Tomoaki HOSHINO, et al.

Serial Number: Not Yet Assigned

Filed: October 30, 2003

**Customer No.: 38834**

For: PREVENTIVE OR THERAPEUTIC AGENTS FOR DERMATITIS OR ALOPECIA,  
EVALUATION METHOD OF THE AGENTS, AND TRANSGENIC MOUSE

**CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119**

Commissioner for Patents  
P. O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

October 30, 2003

Sir:

The benefit of the filing date of the following prior foreign application is hereby requested for the above-identified application, and the priority provided in 35 U.S.C. 119 is hereby claimed:

**Japanese Appln. No. 2003-022876, filed on January 30, 2003**

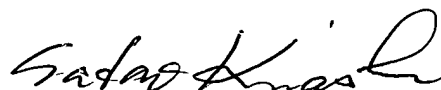
**Japanese Appln. No. 2003-118055, filed on April 23, 2003**

In support of these claims, the requisite certified copies of said original foreign application are filed herewith.

It is requested that the file of these applications be marked to indicate that the applicants have complied with the requirements of 35 U.S.C. 119 and that the Patent and Trademark Office kindly acknowledge receipt of said certified copies.

In the event that any fees are due in connection with this paper, please charge our Deposit Account No. 50-2866.

Respectfully submitted,  
WESTERMAN, HATTORI, DANIELS & ADRIAN, LLP



Sadao Kinashi  
Reg. No. 48,075

Atty. Docket No.: 032079  
1250 Connecticut Ave, N.W., Suite 700  
Washington, D.C. 20036  
Tel: (202) 822-1100  
Fax: (202) 822-1111  
SK/ll

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2003年 1月30日

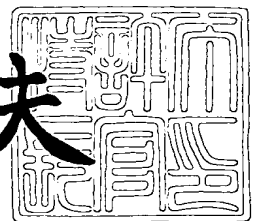
出願番号  
Application Number: 特願2003-022876  
[ST. 10/C]: [JP2003-022876]

出願人  
Applicant(s): 星野 友昭  
日本オルガノン株式会社

2003年10月23日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2003-3087842

【書類名】 特許願

【整理番号】 P03AC001

【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特  
許出願

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A01K 67/027  
C12N 15/09

【発明者】

    【住所又は居所】 福岡県筑紫野市美しが丘南 1 - 8 - 7

    【氏名】 星野 友昭

【発明者】

    【住所又は居所】 大阪府豊中市寺内 2 丁目 3 番 5 - 4 0 1 号

    【氏名】 川瀬 裕介

【発明者】

    【住所又は居所】 北九州市八幡西区引野 3 - 1 - 4

    【氏名】 野見山 佳子

【発明者】

    【住所又は居所】 大阪府堺市百舌鳥西之町 2 丁 2 0 3 番地

    【氏名】 横田 耕一

【発明者】

    【住所又は居所】 大阪府吹田市古江台 1 丁目 2 4 番 5 号

    【氏名】 吉野 公一郎

【特許出願人】

    【識別番号】 500258477

    【氏名又は名称】 星野 友昭

【特許出願人】

    【識別番号】 300003329

    【氏名又は名称】 日本オルガノン株式会社

## 【代理人】

【識別番号】 100113044

【弁理士】

【氏名又は名称】 木島 智子

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 175973

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 トランスジェニックマウスを用いた評価方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ケラチノサイトプロモーターの制御下にあるインターロイキン-18 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用い、被験物の皮膚に与える影響を評価する方法であって、評価指標として下記の (A) 及び／又は (B) を用いることを特徴とする被験物の評価方法。

(A) 自然発症皮膚炎

(B) 起炎物初回投与時の皮膚炎症

【請求項 2】 自然発症皮膚炎が、生後 8 ～ 12 日目にピークを迎えるものであることを特徴とする、請求項 1 記載の評価方法。

【請求項 3】 評価目的が、自己免疫性皮膚炎の予防・治療剤のスクリーニングであることを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載の評価方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、自己免疫性皮膚炎等に代表される皮膚症状に対する、被験物の作用を調べることのできる評価方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、自己免疫皮膚炎における、インターロイキン-18 (以下 IL-18 と記載する。) の果たす役割が注目されており、ケラチノサイトプロモーターの制御下にある IL-18 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスが作成され、当該トランスジェニックマウスを用いて、炎症発生機構の解明が進められている。

【0003】

特に、ケラチノサイトプロモーターの制御下にある IL-18 を皮膚に過剰発現させたトランスジェニックマウスを用いた最近の研究では、IL-18 がトリニトロクロロベンゼン (TNCB) 等の起炎物の繰り返し投与によって誘発される接触性皮膚炎 (遅延性アレルギーの一種) の悪化に深く関与していることが明らかにされ、

IL-18の拮抗剤が新規皮膚炎治療薬の創出に繋がることが示唆されている。

【非特許文献1】 川瀬 裕介, 他8名, “IL-18トランスジェニックマウスではtrinitrochlorobenzene誘発接触性皮膚炎が増強される”, 平成13年9月, 日本研究皮膚科学会第26会年次学術大会・総会・プログラム、144頁

#### 【0004】

本願発明者等は、新規皮膚炎治療薬のスクリーニングに、当該トランスジェニックマウスを用いることを企図したが、このスクリーニング方法は、起炎物の繰り返し投与（週一回・6週間等の投与日数）が必要とされる為、時間がかかるうえ操作が煩雑であるなど実施しづらい面があった。

#### 【0005】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明者等は、ケラチノサイトプロモーターの制御下にあるIL-18遺伝子を導入したトランスジェニックマウスが、生後間もない時期に自然発症的な炎症のピークを迎えること、及び当該ピークが治まった後に、起炎物を一度投与するだけで、皮膚炎を発症することを見だし、本発明に到達したものであって、その目的とするところは、自己免疫性皮膚炎等に代表される皮膚症状に対する、被験物の作用を、簡便かつ短期間で調べることのできる評価方法を提供することにある。

#### 【0006】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明の目的は、ケラチノサイトプロモーターの制御下にあるIL-18遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用い、被験物の皮膚に与える影響を評価する方法であって、評価指標として下記の（A）及び／又は（B）を用いることを特徴とする被験物の評価方法、自然発症皮膚炎が、生後8～12日目にピークを迎えるものであることを特徴とする、当該評価方法、及び評価目的が、自己免疫性皮膚炎の予防・治療剤のスクリーニングであることを特徴とする、当該評価方法によって達成される。

#### 【0007】

（A）自然発症皮膚炎

(B) 起炎物初回投与時の皮膚炎症

【0008】

【発明の実施の形態】

本発明の評価方法で使用するトランスジェニックマウスは、例えば次のような方法で、作成することができる。

【0009】

マウスは、例えば、C57BL/6Nマウス (B6マウス)、Balb/cマウス等が好ましく用いられ、中でも、B6マウスが好ましい。

【0010】

マウスに導入する組換遺伝子は、ケラチノサイトプロモーター及びその制御下にあるIL-18遺伝子を含むものである。

【0011】

ケラチノサイトプロモーターとしては、ヒトケラチノサイト5プロモーター (以下、hK5プロモーターと記載する。) 等が挙げられる。

【0012】

組換遺伝子には、このほか、導入遺伝子の細胞外への放出を促進するためのシグナルペプチド遺伝子や、発現遺伝子の釣り出し等に有用なポリA配列を導入することが好ましい。

【0013】

シグナルペプチドとしては、例えばマウスの免疫グロブリン (以下Igと記載する。)  $\kappa$ -チェーン・シグナルペプチド等が挙げられる。

【0014】

ポリA配列としては、牛由来のポリA配列等が挙げられる。

【0015】

上記を含む組換遺伝子の作出方法としては、遺伝子組み換えの公知の方法を用いることができるが、例示すると、以下の通りである。

【0016】

マウスIg  $\kappa$ -チェーンの、V-J2-C領域から取り出したシグナルペプチドと、マウスのプロIL-18 cDNAを用い、シグナルペプチドを持つ成熟IL-18 cDNAを

、PCR法によって取得する。

【0017】

次に、pCR2.1ベクターを用いてサブクローニングし、続いてヒト伸長因子1 $\alpha$ のプロモーターと牛由来ポリAを含むpcdEF3ベクターで、サブクローニングされ、pEF-IL-18SPとする。

【0018】

KpnI/BbsIの制限酵素切断部位で切断された、pEF-IL-18SPのDNAフラグメントは、ヒトK5プロモーターを含むpBSKベクターのNotI部位において、サブクローニングする。

【0019】

BssHIIの制限酵素部位で切断することによって、直鎖状DNAフラグメント（K5/SP/IL-18/polyA）を得ることができる（図1）。

【0020】

組換え遺伝子をマウスに導入する方法としては、公知の遺伝子導入方法を用いることができるが、例えば、マウスの受精卵に上述のようにして得られた組換え遺伝子を注入したマウスを、野生型のマウスと掛け合わせ、その子孫のうち、IL-18を発現しているものを選別することで、行うことができる。選別する方法としては、尻尾のゲノムDNAを用いたPCR分析、血清中の成熟IL-18のELISA分析、皮膚の成熟IL-18のウェスタンブロッティング分析等が挙げられる。

【0021】

本発明の評価方法において、評価指標として用いられる現象は、以下の2つの炎症反応である。

(A) 自然発症皮膚炎

(B) 起炎物初回投与時の皮膚炎症

【0022】

本発明の評価は、上記の(A)、(B)の2つの一方又は両方において、被験物の効果を確認することによって行われる。

【0023】

(A) の自然発症皮膚炎とは、IL-18導入マウスが生後約8～12日目にピー



クを迎え、およそ4週以降に消失する炎症で、本発明者らによって今回初めて確認された症状である。この炎症は、病理学的には、皮膚組織において、表皮肥厚、角質増殖、真皮内に好中球を含む炎症性細胞浸潤を認め、表皮基底部には軽度の海綿状態が存在し、表皮向性の好中球浸潤により角質内膿瘍形成が認められる(図2)。

#### 【0024】

従って、生後約8～12日間のこれらの症状確認を指標とすることで、従来に比べて極めて短期間で、被験物の炎症予防・治療効果を確認することができ、炎症治療・予防剤のスクリーニングを実施することが可能となる。

#### 【0025】

(B)の起炎物初回投与時の皮膚炎症とは、例えば自然発症皮膚炎のピーク後等に、自然発症皮膚炎のピーク残存中、或いは当該症状が一旦消失した後、起炎物を初めて投与した際に誘発される皮膚炎症のことである。

#### 【0026】

これら(A)、(B)の発症には、いずれもIL-18の過剰発現が関与しており、これらの症状は、従前報告された起炎物の6週間に亘る繰り返し投与に起因して発症する接触過敏症と、発症機構が共通していることが確認された。

#### 【0027】

従って、本発明の、(A)、(B)を指標とする評価方法は、接触過敏症の短期間・かつ簡便な評価方法としても、利用することが可能である。つまり、(A)を指標とすることによって、従来、一旦皮膚炎が治まった後、更に6週間に亘る起炎物の繰り返し投与という長期間を要していた接触過敏症の予防・治療薬のスクリーニングが、生後8～12日前後まで短縮される。また、(B)を指標指標とすることによって、(一旦皮膚炎が消失した後、例えばクロトンオイル等の起炎物で処理することにより惹起される皮膚炎を指標にして)簡便に被験物を評価することもできる。更に、これら(A)、(B)の双方を指標としてスクリーニングを行うこともできる。

#### 【0028】

本発明の評価方法は、自己免疫性皮膚炎の予防・治療剤のスクリーニング方法

として実施することができる。スクリーニングは、例えば自然発症皮膚炎のピーク発生前、発生後のいずれかの段階において被験物を投与し、ピーク発生の有無、ピークの大きさ、ピーク消失の速さ等を、非投与マウス（コントロール）と比較する等の手順によって、行うことができる。

#### 【0029】

##### 【発明の効果】

本発明の評価方法によって、従来、一旦皮膚炎が治まった後、起炎物の繰り返し投与のために更に6週間に亘る長期間を要していた、接触皮膚炎に対する被験物の評価が、生後約8～12日という短期間で、しかも起炎物の投与を一切行わないで評価することができる。あるいは、起炎物の繰り返し投与という面倒な作業を経ることなく、簡便に行うことができる。

#### 【0030】

##### 【実施例】

以下に実施例を上げて本発明を更に具体的に説明する。尚、評価方法の実施例に先立ち、本発明の評価指標の一つである（B）起炎物初回投与時の皮膚炎症を発症させる系（コントロール）を確立した。

#### 【0031】

##### （B）起炎物初回投与時の皮膚炎症の発症

雄の、K5/IL-18トランスジェニックB6マウス（11週令）、Ig/IL-18トランスジェニックB6マウス（10～12週令）（T. Hoshino, J. Immunology, 2001, 7014-7018）及び当該週令のB6マウス（ワイルドタイプ）の右の耳に夫々10 $\mu$ lのアセトン/オリーブオイル（4:1, v/v）にクロトンオイルを2%（v/v）溶解させたクロトンオイル溶液を塗付し、左の耳に10 $\mu$ lのアセトン/オリーブオイル（4:1, v/v）を塗付した。夫々、0、6、24、48時間及び7日後に耳の厚さを計測した。

#### 【0032】

結果を図3に示した。

図3に示すとおりK5/IL-18トランスジェニックB6マウスにおいては48時間後まで有意な耳介の腫脹が認められた。一方、Ig/IL-18トランスジェニックB6マウスや、ワイルドタイプマウスでは、48時間後には、耳介の腫脹は消失していた

## 【0033】

## 実施例 1 (自己免疫性皮膚炎予防・治療剤のスクリーニング)

被験物(予防・治療剤の候補化合物)をアセトン/オリーブオイル(4:1, v/v)等の適当な溶剤(左耳に塗布する溶剤と同じもの)に溶解又は懸濁させたものを、2%(v/v)クロトンオイル溶液塗布の前又は同時或いは塗布後に、適宜右の耳に塗付するほかは上記の(B)と同様にして処理し、24時間後の耳介の腫れを計測し、コントロールの系との比較により、被験物による耳介の腫脹の抑制効果を判定する。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明で用いられる組換え遺伝子の一例である。

【図2】生後10日目で自然発症皮膚炎のピークを迎えたK5/IL-18トランスジェニックマウスの皮膚の病理標本(生物の形態)を示す図面代用写真である。

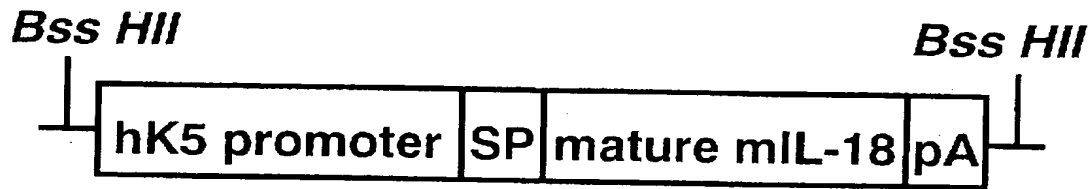
【図3】(B)起炎物初回投与時の皮膚炎症の発症を示す図である。

## 【符号の説明】

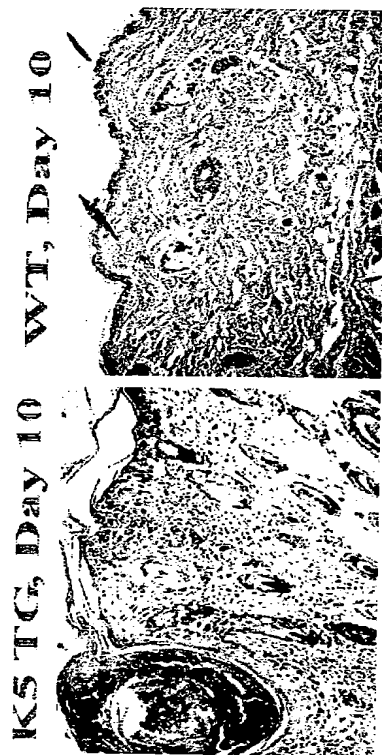
hK 5 promoter : hK5プロモーター  
S P : シグナルペプチド  
mature mIL-18 : 成熟マウスIL-18遺伝子  
p A : ポリA配列  
K 5 T G : K5/IL-18トランスジェニックB6マウス  
W T : ワイルドタイプB6マウス  
K5/IL-18Tg : K5/IL-18トランスジェニックB6マウス  
Ig/IL-18Tg : Ig/IL-18トランスジェニックB6マウス  
T G : K5/IL-18Tg, 又はIg/IL-18Tg  
vehicle : アセトン/オリーブオイル(4:1, v/v)  
croton oil : クロトンオイルの2%(v/v) アセトン/オリーブオイル(4:1, v/v) 溶液

【書類名】 図面

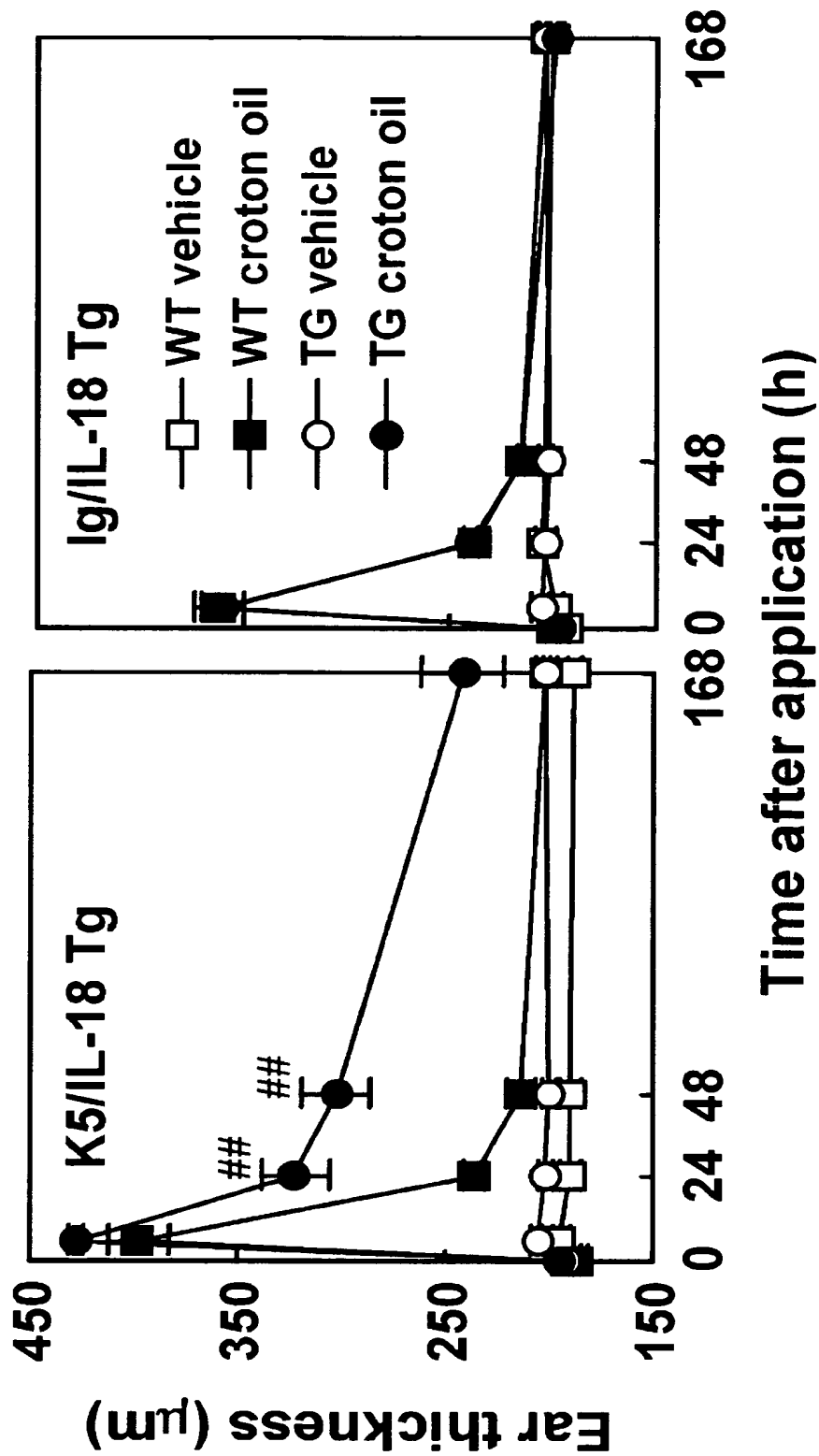
【図 1】



【図 2】



【図 3】



**【書類名】 要約書****【要約】**

**【課題】** 自己免疫性皮膚炎等に代表される皮膚症状に対する、被験物の作用を、簡便かつ短期間で調べることのできる評価方法を提供すること。

**【解決手段】** ケラチノサイトプロモーターの制御下にあるインターロイキン-18 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用い、被験物の皮膚に与える影響を評価する方法であって、評価指標として下記の (A) 及び／又は (B) を用いることを特徴とする被験物の評価方法。

(A) 自然発症皮膚炎

(B) 起炎物初回投与時の皮膚炎症

**【選択図】** なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 0 2 2 8 7 6
受付番号	5 0 3 0 0 1 5 1 7 6 5
書類名	特許願
担当官	第二担当上席 0 0 9 1
作成日	平成 1 5 年 4 月 1 0 日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成15年 1月30日
-------	-------------

次頁無

特願 2003-022876

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[500258477]

1. 変更年月日

2000年 4月25日

[変更理由]

新規登録

住 所

福岡県筑紫野市美しが丘南1-8-7

氏 名

星野 友昭



特願 2 0 0 3 - 0 2 2 8 7 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 3 0 0 0 0 3 3 2 9 ]

1 . 変 更 年 月 日

1 9 9 9 年 1 2 月 2 7 日

[ 変 更 理 由 ]

新 規 登 録

住 所

大 阪 府 大 阪 市 都 島 区 友 渕 町 一 丁 目 5 番 9 0 号

氏 名

日 本 オ ル ガ ノ ン 株 式 会 社